

JP10094399 A

PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE ALCOHOL USING ENZYME

FUKUI PREF GOV SANGYO SHINKO ZAIKAN

Inventor(s): ITO SHINYA ; MIYAZAKI KOJI ; MAKINO KIMIHIRO ; KUROSE  
MIKIHIKO

Application No. 08251054 JP08251054 JP, Filed 19960924, A1 Published 19980414

**Abstract:** PROBLEM TO BE SOLVED: To produce an optically active alcohol of high purity by utilizing an enzyme occurring in a styrene- assimilating *Corynebacterium*.

**SOLUTION:** The phenyl X-acetaldehyde reductase collected from a styreneassimilating *Corynebacterium* is utilized to effect the reaction of a ketone at 20-40 °C in the presence of NADH or NADPH as a coenzyme in a buffer solution of a pH of 6-7 whereby the ketone is reduced stereospecifically to give an optically active alcohol of high purity.

*applicant's note :*

The results of the Examples listed on page 4 of this Japanese specification to Itoh et. al are the same as the test results disclosed in Table 1, page 46 of the Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 6 (1999) 41-50 by .. Itoh et al.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-94399

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月14日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 P 41/00

識別記号

F I  
C 1 2 P 41/00

C

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平8-251054

(22) 出願日 平成 8 年(1996) 9 月24日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成 8 年 4 月 1 日  
開催の「日本農芸化学会1996年度大会」において文書をもつて発表

(71) 出願人 391059621

財団法人福井県産業振興財団  
福井県福井市川合鶯塚町61字北稲田10 工業技術センター内

(72) 発明者 伊藤 伸哉

福井県福井市文京 5-13-7

(72) 発明者 宮崎 孝司

福井県福井市桃園 1-3-18

(72) 発明者 牧野 公博

福井県鯖江市下野田町31-33

(72) 発明者 黒瀬 幹彦

福井県吉田郡松岡町下合月31-10

(54) 【発明の名称】 酵素を用いる光学活性アルコールの製造法

(57) 【要約】

【目的】 スチレン資化性コリネバクテリウム細菌が含有する酵素を利用して純度の高い光学活性アルコールを製造する。

【構成】 スチレン資化性のコリネバクテリウム細菌から採取したフェニルアセトアルデヒド還元酵素を利用して、20～40℃の温度条件下で、補酵素としてNADHもしくはNADPHの添加されたpH6～7の緩衝溶液中で、ケトン類を反応させることにより、ケトン類は立体選択的に還元され、純度の高い光学活性アルコールを製造することができる。

(2)

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フェニルアセトアルデヒド還元酵素と補酵素NADHまたはNADPHの存在下、もしくはNADHまたはNADPHの再生条件下において種々のケトン類を立体選択的に還元し光学活性なアルコールを得ることを特徴とする酵素を用いる光学活性アルコールの製造法。

【請求項 2】 フェニルアセトアルデヒド還元酵素がスチレン資化性コリネバクテリウム細菌より得られたものである特許請求の範囲第 1 項記載の酵素を用いる光学活性アルコールの製造法。

【請求項 3】 スチレン資化性コリネバクテリウム細菌がコリネバクテリウム・シュウドジフテリティカムおよびその亜種ならびにコリネバクテリウム属細菌の新種のいずれかである特許請求の範囲第 2 項記載の酵素を用いる光学活性アルコールの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は酵素を用いる光学活性アルコールの製造法に関する。光学活性アルコールは医薬品及びその中間体、香料、農薬の原料等産業上幅広く利用されている。しかし、こうした光学活性アルコールの製造には天然物からの抽出、ラセミ体の光学分割もしくは不斉触媒による合成法が使用されているが、一般的には製造法が複雑であり、結果として得られる製品は高価なものにならざるを得ない。従って、酵素を用い、こうした光学活性アルコールを安価に製造できることは産業上きわめて有効な方法となりうる。

## 【0002】

【従来の技術】 これまでにも酵素もしくは生体触媒を用いる光学活性アルコールの製造法がいくつか報告されている。すなわち、パン酵母もしくは酵母 *Pichia* を用いて 2-ケトエステルから (S)-ヒドロキシエステルが合成できること(酵素合成と精密有機化学, p.112 (1984)), *Cryptococcus* 酵母を用いて 2-クロロアセトフェノンから (R)-2-クロロ-1-フェニルエタノールが合成できること(J. Org. Chem., 43, 4540 (1978), 同, 45, 3352(1980)), また人参細胞を用いてアセトフェノンから (S)-1-フェニルエタノールが生産すること(J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 1295 (1995))などの報告である。しかし、産業上の利用を可能ならしめるためには、酵素もしくは生体触媒が安定で反応性が高いことまた容易に調製できること、さらに光学活性収率が高くなければならない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 酵素もしくは生体触媒を光学活性化合物の製造に用いるためには、酵素の安定かつ安価な供給をすることが必須条件である。しかし、人参細胞などの調製は複雑であり問題がある。また、酵母の培養は容易であるが、目的の化合物に対する反応性が不十分であったり、光学活性が低いなど従来技術のままで利用できなかった。

2

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者はこうした背景において、産業的に利用できる酵素を求め鋭意検討を重ねた結果、スチレン資化性コリネバクテリウム細菌が含有するフェニルアセトアルデヒド還元酵素(Phenylacetaldehyde reductase、以下「PAR」という)にすぐれた触媒活性が存在することを見出し、その諸性質および製造法を確立した。本酵素は、反応条件下でも安定であり、なおかつ幅広い基質の変換反応を高い光学活性収率で触媒することを見出し本発明を完成した。

【0005】 本発明で使用されるPARは、スチレン資化性コリネバクテリウム細菌より取得したものであり、スチレン資化性のコリネバクテリウム細菌であれば、いずれのものも用いられるが、具体的にはコリネバクテリウム・シュウドジフテリティカム(*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*) ST-21株(微工研菌寄第13149号)、コリネバクテリウム・シュウドジフテリティカム亜種ST-10株(微工研菌寄第13150号)、コリネバクテリウム属新菌ST-5株(微工研寄第13151号)、コリネバクテリウム属新菌AC-5株(微工研菌寄第13807号)などが挙げられる。

【0006】 上記菌株を培養する培地としては、炭素源、窒素源、無機栄養塩を含む培地であれば、合成培地、天然培地いずれも用いることができる。炭素源としてはPARが誘導酵素であることから、スチレン系化合物を使用することが望ましい。こうした化合物として、スチレン、スチレンオキシドなどが使用できる。揮発性のスチレン化合物は、同化合物を含んだ空気とともに培地に逐次添加する。窒素源としては酵母エキス、ペプトン、肉エキス等が使用される。無機物としてはカリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、亜鉛などの金属が必要に応じて使用される。培養温度は菌が生育しPARが生産される範囲であれば、いずれの温度でもよいが、好ましくは25~35℃である。培地のpHは通常5~7の範囲で行われる。培養時間は酵素活性が最大になる時間を選ぶべく通常48~72時間である。

【0007】 以上のように得られた培養物からPARを採取するには、本酵素が菌体内に存在するため、先ず菌体から酵素の抽出を行う。すなわち培養物をろ過または遠心分離して菌体を集め、アルミナ、ダイノミルなどの機械的方法あるいはアセトンなどの有機溶媒処理などによって本酵素を抽出する。その後、ろ過もしくは遠心分離によって固形物を除き粗酵素液を得、さらに濃縮、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜組み合わせることにより精製PAR標品が得られる。

【0008】 本酵素の活性測定法は、0.27mM NADHもしくはNADPH、3mMフェニルアセトアルデヒド、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)、酵素溶液0.02mlを含む1.5mlの反応液を混合し25℃で反応させ、反応開始後数分間の340nmにお

(3)

3

ける吸光度の減少を測定する。酵素活性の表示は、上記条件で1分間に1 $\mu$ モルのNADHを減少させる酵素量を1単位とした。

【0009】次に コリネバクテリウム・シュードジフテリティカム亜種ST-10 株より得られたPARの物理化学的性質について述べる。

#### (1) 分子量とサブユニット構造

同酵素の分子量は高速液体クロマトグラフィーによる測定で、約140,000と算定された。また電気泳動による測定で、同酵素は分子量約35,000の同一のサブユニットより構成されていることが判明した。従ってPARは4量体酵素と推定された。(2) 作用

NADHの存在下、フェニルアセトアルデヒドを2-フェニルエタノールに還元する反応を触媒する。逆反応を触媒しないことから2-フェニルエタノール脱水素酵素ではない。本酵素は逆反応を触媒しないことからケトン類から光学活性アルコールを生産する場合、反応が終点まで進行するという利点がある。フェニルアセトアルデヒドに対する $K_m$ 値は2mMまたNADHに対する $K_m$ 値は0.01mMであった。

#### (3) 基質特異性

本酵素はフェニルアセトアルデヒド以外に、ケイ皮アルデヒド、3-フェニルプロピオンアルデヒドなどの芳香族アルデヒドに作用する。またアセトフェノンなどの種々の芳香族ケトンに作用し相応する光学活性アルコールを生成する。

#### (4) 至適pH

pH6~6.5で最大活性を示した。pH5以下およびpH8.5以上では活性は著しく低下した。

【0010】本発明による光学活性アルコールの製造は一般的に次のような条件で行われる。まずpHに関しては通常pH6~7の範囲の緩衝液中で行う。使用する緩衝液は、反応を行わせるpHで緩衝能を有するものであればいずれのものも使用できるが、通常リン酸塩を含む緩衝液が好適である。反応温度は、使用するPARが活性を有する温度範囲であればいずれでもよいが、好ましくは20~40℃付近である。PARは補酵素としてNADHもしくはNADPHを必要とすることから、反応液には適宜NADHまたはNADPHを添加する。また補酵素を再生する目的でギ酸脱水素酵素などの酵素を用いて、補酵素の再生を行いつつ反応を行わせることも可能である。本発明で使用される基質は、本酵素反応により還元を受けるものであればいずれの化合物でも使用され得るが、一般的には芳香環を有するケトン類である。上記基質を使用する場合は、反応液中に溶解した状態であることが望ましいが、水に難溶性の基質であっても少量のエタノール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドの極性溶媒に溶解後、これを反応液に入れ、十分に分散させた状態で使用しても構わない。また超音波処理等によって分散しても構わない。

4

\* い。使用するNADHもしくはNADPHの量は、添加した基質に対していくらか過剰のモル量存在すれば良い。また補酵素の再生系が共存する場合は、使用するNADHもしくはNADPHの量は触媒量で良い。以上のようにして反応した結果、生成した化合物の確認には、標準化合物が入手できる場合は、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等の常法を使用した。また光学異性体の確認には、キラルカラムを使用したガスクロマトグラフィーもしくは高速液体クロマトグラフィーを使用した。さらに必要な場合は、旋光度の測定を行った。また反応生成物の分離は、反応終了後、溶媒で抽出、シリカゲルなどを用いるクロマトグラフィーにより行った。もちろん、本発明により得られた生成物の分離精製には、他の一般的な精製法を組み合わせても使用できる。

#### 【0011】

【実施例】以下、実施例で本発明の内容を具体的に説明する。

#### 実施例 1

20 0.3%の硫酸、0.3%のリン酸二カリウム、0.1%のNaCl、0.02%の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ および0.01%の酵母エキスを含む寒天培地(pH7.0)の表面にコリネバクテリウム・シュードジフテリティカム亜種ST-10 株を全面に接種し30℃、72時間培養した。炭素源およびPARの誘導剤としてスチレンを使用し、スチレンは小型のダークラム管に200 $\mu$ l入れ気相系で供給した。培養後菌体を寒天培地の表面からかき取り、磨砕用アルミナと混合し乳鉢にて破碎し、50mMリン酸緩衝液を用いて酵素を抽出した。抽出液を遠心分離(12,000rpm, 20分間)し、得られた上清を粗酵素液とした。粗酵素液を前述の緩衝液にて透析後、同緩衝液にて平衡化したDEAE-セファロース(ファルマシア社製)カラムに吸着させ、カラムを洗浄後0~1.0Mの食塩濃度勾配によりPARを溶出した。酵素活性を示す画分を濃縮し、1.8Mの硫酸を含む同緩衝液で平衡化したフェニルトヨバール(東ソー社製)カラムに吸着させ、カラムを洗浄後1.8~0Mの硫酸の逆濃度勾配により酵素を溶出した。次に酵素活性を示す画分を濃縮し、上記緩衝液で平衡化したセルロファインGCL-2000sfカラム(チッソ社製)にて分離した。本操作により、約5gの湿菌体より60単位の精製PARを得た。次に、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)、5mM NADH、2~3mMの表-1記載の基質、上記の操作で得られた酵素溶液0.05ml(PAR0.5単位)を含む0.5mlの反応液を混合し25℃で2時間反応させ、反応終了後、生成物を同量の酢酸エチルで抽出した。生成したアルコールの光学純度をC P-シクロデキストリン-B-236-N19カラム(ジーエルサイエンス社製)を用いるガスクロマトグラフィーまたはキラルセルOB-H(ダイセル社製)カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーにより、標準化合物との比較により決定した。表-1にその結果を示す。

(4)

5	6
基 質	相 対 反 応 速 度 (%)
生 成 物	鏡 像 体 過 剰 率 (%)
フェニルアセトアルデヒド	100
アセトフェノン	35
2-クロロアセトフェノン	8
2-ブ'ロモアセトフェノン	2
2'-クロロアセトフェノン	17
2'-ブ'ロモアセトフェノン	5
3'-クロロアセトフェノン	674
3'-ブ'ロモアセトフェノン	811
4'-クロロアセトフェノン	338
4'-ブ'ロモアセトフェノン	380
プロピオフェノン	2
2-フェニルエタノール	—
(S)-(-)-1-フェニルエタノール	96
(R)-(-)-2-クロロ-1-フェニルエタノール	99
(R)-(-)-2-ブ'ロモ-1-フェニルエタノール	99
(S)-(-)-1-(2-クロロフェニル)エタノール	100
(S)-(-)-1-(2-ブ'ロモフェニル)エタノール	100
(S)-(-)-1-(3-クロロフェニル)エタノール	100
(S)-(-)-1-(3-ブ'ロモフェニル)エタノール	88
(S)-(-)-1-(4-クロロフェニル)エタノール	100
(S)-(-)-1-(4-ブ'ロモフェニル)エタノール	100
(S)-(-)-1-フェニル-1-プロパノール	100

## 【0012】実施例2

コリネバクテリウム属新菌ST-5株を使用して、実施例1と同様に操作したところ、40単位の精製PARを得た。また、得られたPARを実施例1と同様に反応させたところ、表-1と同等の結果が得られた。

## 実施例3

100 mMリン酸緩衝液(pH7.0) 100mlに154mgの3'-クロロアセトフェノンを懸濁し、この溶液に1.36gのギ酸ナトリウム、0.5mMのNADH、実施例1で得られた5単位のPARおよび5単位のギ酸脱水素酵素(ペーリンガー社製)を添加し、25℃にて7日間振とうして反応させた。ガスクロマトグラフィーによる分析では、ほぼ100%の収率で(S)-(-)-1-(3-クロロフェニル)エタノールが得られた。反応後、等量の酢酸エチルにて生成物を抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分を無水硫酸ナトリウムにより乾燥し、減圧濃縮により100mgの(S)-(-)-1-(3-クロロフェニル)エタノールを得た。生成物の比旋光度は、 $[\alpha] = -29.9^\circ$  (C=2, CHCl<sub>3</sub>, 25℃, D線)であった。

## 実施例4

実施例2で得られた5単位のPARを用いて、154mgの4'-クロロアセトフェノンを実施例3と同様に反応させ、等量の酢酸エチルにて生成物を抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。本操作により、80mgの(S)-(-)-1-(4-クロロフェニル)エタノールを得た。生成物の比旋光度は、 $[\alpha] = -37.6^\circ$  (C=2, CHCl<sub>3</sub>, 25℃, D線)であった。

## 【0013】実施例5

100 mMリン酸緩衝液(pH7.0) 100mlに120mgのアセトフェノンを懸濁し、この溶液に1.36gのギ酸ナトリウム、2mMのNADH、実施例1で得られた10単位のPARおよび10単位のギ酸脱水素酵素(ペーリンガー社製)を添加し、25℃にて14日間振とうして反応させた。ガスクロマトグラフィーによる分析では、ほぼ100%の収率で(S)-(-)-1-フェニルエタノールが得られた。反応後、等量の酢酸エチルにて生成物を抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分を無水硫酸ナトリウムにより乾燥し、減圧濃縮により80mgの(S)-(-)-1-フェニルエタノールを得た。

## 実施例6

154mgの2-クロロアセトフェノンを実施例5と同様に反応させ、等量の酢酸エチルにて生成物を抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。本操作により、70mgの(R)-(-)-2-クロロ-1-フェニルエタノールを得た。

## 実施例7

実施例2で得られたPARを用いて、134mgのプロピオフェノンを実施例5と同様に反応させた。変換収率は、90%であった。反応後、等量の酢酸エチルにて生成物を抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。本操作により、50mgの(S)-(-)-1-フェニル-1-プロパノールを得た。

## 【0014】

【発明の効果】本発明は、光学活性アルコールを酵素反応を利用して製造する方法を提供するものであり、産業上きわめて有効な方法となりうる。